

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152552

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

超急性排斥反应靶向抗肿瘤体外实验研究

Hyperacute rejection effects of target oncolysis by empirical
study in vitro

唐晶

指导教师姓名: 赵永祥 教授

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩时间: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 月

αCD_3 介导的超急性排斥反应靶向杀伤肿瘤细胞

指导教师

赵永祥

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(赵永祥)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金30660185, 30000203)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学眼科研究所及广西医科大学医学科学实验中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

| | |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| 目 录 | I |
| Table of contents | IV |
| 摘 要 | VII |
| Abstract | IX |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 肿瘤生长的最主要生物学特性 | 2 |
| 1.2 移植排斥反应的类型 | 4 |
| 1.2.1 宿主抗移植反应 (HVGR) | 5 |
| 1.2.2 移植物抗宿主反应 (GVHR) | 7 |
| 1.3 超急性排斥反应理论在肿瘤治疗当中的应用 | 7 |
| 1.3.1 $\alpha 1, 3GT$ | 7 |
| 1.3.2 α -Gal 抗原和抗 α -Gal 抗体在动物中的分布 | 8 |
| 1.3.3 应用 | 9 |
| 1.4 端粒、端粒酶及 hTERT | 12 |
| 1.5 本研究的目的及意义 | 14 |
| 1.6 技术路线 | 14 |
| 第二章 质粒的构建 | 15 |
| 2.1 材料、试剂及仪器 | 15 |
| 2.1.1 材料 | 15 |
| 2.1.2 试剂 | 15 |
| 2.1.3 主要实验仪器 | 15 |
| 2.2 实验方法 | 15 |
| 2.2.1 $\alpha 1,3GT$ 目的基因的获取及重组表达载体 p EGFP- $\alpha 1,3GT$ 的构建 | 15 |
| 2.2.2 目的基因 hTERT 的获得及重组表达载体 p EGFP-hTERT- $\alpha 1,3GT$ 的 | |

| | |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 构建 | 20 |
| 2.3 结果 | 23 |
| 2.3.1 pEGFP- α 1,3GT 质粒的构建。 | 23 |
| 2.3.2 p EGFP- α 1,3GT 质粒酶切鉴定结果。 | 25 |
| 2.3.3 pEGFP-h TERT- α 1,3GT 质粒的构建 | 26 |
| 2.3.4 p EGFP-h TERT - α 1,3GT 质粒酶切鉴定结果。 | 27 |
| 2.4 结论 | 28 |
| 第三章 重组质粒转染 | 29 |
| 3.1 材料、试剂及仪器 | 29 |
| 3.1.1 材料 | 29 |
| 3.1.2 主要试剂 | 29 |
| 3.1.3 主要实验仪器 | 29 |
| 3.2 方法 | 29 |
| 3.2.1 质粒大提 | 29 |
| 3.2.2 A549、293FT 细胞及原代 HUVEC 内皮细胞培养 | 30 |
| 3.2.3 重组质粒用脂质体法转染 A549、293FT 细胞 | 31 |
| 3.2.4 目的基因 α 1,3GT 在 A549 细胞中瞬时表达的免疫荧光化学检测: | 33 |
| 3.2.5 目标蛋白 α -Gal 的 Western Blot 鉴定 | 34 |
| 3.2.6 重组质粒电穿孔法转染原代 HUVEC 内皮细胞 | 36 |
| 3.3 结果 | 36 |
| 3.3.1 A549、293FT 细胞生长形态显微镜下观察结果。 | 36 |
| 3.3.2 原代 HUVEC 细胞生长形态及鉴定。 | 37 |
| 3.3.3 荧光显微镜下观察不同质粒转染 A549 细胞及 293FT 细胞 48 小时后的结果 | 38 |
| 3.3.4 质粒转染 A549 细胞 48 小时后的结果 | 39 |
| 3.3.5 RT-PCR 实验条件的优化 | 40 |
| 3.3.6 RT-PCR 实验结果 | 40 |
| 3.3.7 GSIB-4 荧光染色实验结果 | 41 |
| 3.3.8 Western Blot 实验结果 | 42 |
| 3.3.9 流式细胞仪检测不同质粒转染 A549 细胞和原代 HUVEC 细胞。 | 43 |

| | |
|----------------------------------------------|----|
| 3.4 结论 | 45 |
| 第四章 α -Gal 抗原介导的超急性排斥反应靶向杀伤肿瘤细胞 | 46 |
| 4.1 材料与方法 | 46 |
| 4.1.1 材料 | 46 |
| 4.1.2 方法 | 46 |
| 4.2 结果 | 46 |
| 4.2.1 MTT 法检测的结果 | 46 |
| 4.3 结论 | 47 |
| 第五章 讨论 | 49 |
| 展 望 | 55 |
| 参 考 文 献 | 56 |
| 附 录 | 66 |
| 致 谢 | 71 |

Table of contents

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Abstract in Chinese | VII |
| Abstract in English | IX |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 The main bionomics of tumor growth | 2 |
| 1.2 The rejective reaction types of transplantation | 4 |
| 1.2.1 Host versus graft reaction..... | 5 |
| 1.2.2 Graft versus host reaction..... | 7 |
| 1.3 The theory of hyperacute rejection in oncotherapy | 7 |
| 1.3.1 α 1, 3 GT gene..... | 7 |
| 1.3.2 The distribution of α -Gal antigen and anti α -Gal antibody in animals ... | 8 |
| 1.3.3 Application | 9 |
| 1.4 Telomere, telomerase and hTERT | 12 |
| 1.5 Objective and significance of this study | 14 |
| 1.6 Technical route | 14 |
| Chapter 2 Construction of Plasmids | 15 |
| 2.1 Materials,Reagents and Instruments | 15 |
| 2.1.1 Materials | 15 |
| 2.1.2 Reagents..... | 15 |
| 2.1.3 Instruments | 15 |
| 2.2 Methods of Experiments | 15 |
| 2.2.1 The construction of p EGFP- α 1,3GT | 15 |
| 2.2.2 The construction of p EGFP-hTERT- α 1,3GT | 20 |
| 2.3 Results | 23 |
| 2.3.1 The Construction Map of p EGFP- α 1,3GT | 23 |
| 2.3.2 Digestion of p EGFP- α 1,3GT plasmid by specific enzymes. | 25 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.3 The Construction Map of p EGFP-h TERT- α 1,3GT | 26 |
| 2.3.4 Digestion of p EGFP--h TERT- α 1,3GT plasmid by specific enzymes. .. | 27 |
| 2.4 Conclusion | 28 |
| Chapter 3 The transfection of • recombinant plasmids | 29 |
| 3.1 Materials,Reagents and Instruments | 29 |
| 3.1.1 Materials | 29 |
| 3.1.2 Reagents..... | 29 |
| 3.1.3 Instruments | 29 |
| 3.2 Methods of Experiments | 29 |
| 3.2.1 The max- extraction of plasmids | 29 |
| 3.2.2 Cell culture for A549 ,293FT cell lines and primary HUVEC | 30 |
| 3.2.3 Transfect A549 ,293FT cell lines by liposome | 31 |
| 3.2.4 Detecting the expression of target α 1,3GT gene in A549 cell line by immunofluorescence staining | 33 |
| 3.2.5 Detecting the α -Gal protein by Western Blot | 34 |
| 3.2.6 Transfect primary HUVEC by electroporation..... | 36 |
| 3.3 Results..... | 36 |
| 3.3.1 The Morphous of A549 and 293FT cell lines. | 36 |
| 3.3.2 The primary HUVEC Morphous and the detection of VIII factor. | 37 |
| 3.3.3 The transfect results of A549 and 293FT cell lines by different plasmids under fluorescence microscope | 38 |
| 3.3.4 The transfection results of A549 cell lines by different plasmids under confocal microscopy | 39 |
| 3.3.5 Setting the Tm of the production of RT-PCR..... | 40 |
| 3.3.6 RT-PCR amplification of α 1, 3 GT and EGFP DNA fragments..... | 40 |
| 3.3.7 The results of GSIB4 immunofluorescence staining | 41 |
| 3.3.8 WB..... | 42 |
| 3.3.9 The detection of positive expression by flow cytometry after transfection | 43 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4 Conclusion | 45 |
| Chapter 4 Hyperacute rejection effects of target oncolysis mediated | |
| by α -Gal antigen | 46 |
| 4.1 Materials and methods | 46 |
| 4.1.1 Materials | 46 |
| 4.1.2 Methods | 46 |
| 4.2 Results | 46 |
| 4.3 Conclusion | 47 |
| Chapter 5 Discussion | 49 |
| Prospects | 55 |
| References | 56 |
| Appendix | 66 |
| Acknowledgements | 71 |

摘要

目的: 构建带有特异人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 启动子及猪 α 半乳糖基转移酶 (α 1,3GT 基因) 的真核表达载体, 使目的基因选择性地在肿瘤细胞中表达 α 半乳糖 (α -Gal) 抗原表位, 不影响其它正常组织细胞, 通过人体内预存的天然抗 α -Gal 抗体激活超急性排斥反应从而准确的杀伤肿瘤细胞。

方法: 通过基因克隆的方法构建带有绿色荧光蛋白的异源 α 1,3GT 基因的 p EGFP- α 1,3GT 重组质粒及 p EGFP-h TERT- α 1,3GT 重组质粒。测序鉴定构建成功的重组质粒通过脂质体法转染 A549 (人肺腺癌细胞系) 及电穿孔法转染原代 HUVEC (人脐静脉内皮细胞), 通过荧光显微镜、观察目标蛋白的定位, 流式细胞仪观察重组质粒的阳性表达率, 通过四种不同血型的血清溶解实验观察重组质粒杀伤肿瘤细胞的效果。

结果: 成功构建了重组质粒 p EGFP- α 1,3GT 及 p EGFP-h TERT- α 1,3GT, 成功转染 A549 和原代 HUVEC, 经流式细胞仪检测出 p EGFP-N1, p EGFP- α 1,3GT 及 p EGFP-h TERT- α 1,3GT 质粒在 A549 细胞当中平均阳性表达率分别为: 59.1%, 24.15%, 34.85%, 在 HUVEC 细胞中三种质粒平均阳性表达率分别为: 16%, 11.5%, 4.5%。结合两重组质粒在 A549, HUVEC 中阳性率, 经统计学分析得出: 在 A549 细胞中三种质粒阳性表达率分别与阴性对照组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), p EGFP-h TERT- α 1,3GT 组的阳性率与 p EGFP- α 1,3GT 组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 HUVEC 中 p EGFP-N1 组和 p EGFP- α 1,3GT 组的阳性表达率分别与阴性对照组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但是 p EGFP-h TERT- α 1,3GT 组的阳性率与阴性对照组比较没有统计学意义 ($P > 0.05$), 即在 HUVEC 细胞中 p EGFP-h TERT- α 1,3GT 组基本没有阳性表达。在血清溶解实验中: 两重组质粒对 A549 细胞的杀伤作用在 A 型血清组中有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在 B, AB, O 型血清组中没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论: 1. 导入的异源 α 1,3GT 基因在人来源的 A549 细胞及 HUVEC 内皮细胞上能够表达 α -Gal 抗原; 2. 重组质粒转染 A549 细胞及 HUVEC 后, p EGFP-h TERT- α 1,3GT 较 p EGFP- α 1,3GT 更能特异定位在 A549 细胞中表达。3. 实验

可控条件一致的情况下，两重组质粒在 A 型血清组中对 A549 细胞的杀伤作用有统计学意义。4. 构建带有绿色荧光的重组质粒有可能作为体内示踪标记。

关键词： α 1,3GT 基因；超急性排斥反应；细胞溶解

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Objective : To construct the p EGFP--h TERT- α 1,3GT plasmid which can selectivity express α -Gal antigen in the tumor cells nor normal tissue and cells. To induce hyperacute rejection by anti α -Gal natural antibody for precisely kill the tumor cells.

Methods: To construct and identify the p EGFP- α 1,3GT and p EGFP--h TERT- α 1,3GT plasmids by the methods of gene cloning. To transfect A549 cell line by liposome and primary HUVEC by electroporation. Detect the expression of positive rate by fluorescent microscope and flow cytometry. Evaluate the effects of oncolysis by four types of serum.

Results: A549 cell line and primary HUVEC can be successfully transfected, the average positive expression of p EGFP-N1, p EGFP- α 1,3GT and p EGFP-h TERT- α 1,3GT plasmids are : 59.1%, 24.15%, 34.85% respectively in A549 cell line and higher than that in primary HUVEC. The average positive rate of p EGFP-N1, p EGFP- α 1,3GT and p EGFP--h TERT- α 1,3GT plasmids are : 16%, 11.5%, 4.5% respectively in primary HUVEC. The statistical analysis of positive expression rate in A549 and HUVEC indicated that p EGFP-h TERT- α 1,3GT plasmids is more specifically located in A549 than p EGFP- α 1,3GT. The results are as followed: firstly, in A549 cell lines, the all plasmids group are compared with negative control group respectively have statistical significance ($P < 0.05$), especially, the p EGFP-h TERT- α 1, 3 GT group is compared with p EGFP- α 1, 3 GT group also have statistical significance ($P < 0.05$). Secondly, the p EGFP-h TERT- α 1, 3 GT group is considered as negative expression in HUVEC by the analysis of Bonferroni ($P > 0.05$), however, the p EGFP- α 1, 3GT group have positive expression ($P < 0.05$). The experiment of oncolysis manifested that this two recombinant plasmids groups also can lead to the cell death of A549 cells in group A serum nor in the other serum groups.

Conclusion: 1. The heterogenesis gene of α 1,3GT can express α -gal protein in

A549 cell line and HUVEC; 2. p EGFP--h TERT- α 1,3GT is more specifically located in A549 than p EGFP- α 1,3GT. 3. The oncolysis effect of p EGFP-h TERT- α 1,3GT plasmid is more powerfully than p EGFP- α 1,3GT in type A serum. 4. This two recombinant plasmids which can be used as trace labeling .

Keywords: α 1,3GT gene; Hyperacute rejection; Oncolysis effect

第一章 前言

从 20 世纪至今，肿瘤已经成为发达国家和正成为发展中国家疾病的主要死亡原因之一。尽管手术加化学治疗、放射治疗等的不断改进，但仍发生不可预测的恶性肿瘤细胞远处转移，给肿瘤的根治带来了障碍。

2006 年 5 月，《Nature》杂志及其系列刊物回顾了自 1889 年以来肿瘤研究历史中的各个里程碑事件：

1889 年提出的种子与土壤假说；1890 年：肿瘤是一种遗传性的疾病；1909 年：免疫监视；1910 年：病毒与肿瘤；1915 年：激素与肿瘤；1937：肿瘤干细胞；1939 年：肿瘤血管发生；1950 年：吸烟与肿瘤；1953 年：二次突变假说；1960 年：染色体易位；1971 年：肿瘤抑制基因；1972 年：细胞凋亡与肿瘤；1975 年：肿瘤微环境；1976 年：克隆演变与多步骤肿瘤发生，病毒癌基因的细胞同系物；1978 年：调控细胞生长增殖的癌基因编码蛋白；1979 年：第一个人类癌基因；1983 年：癌基因的协同作用，肿瘤表观遗传学；1989 年：细胞周期和 DNA 损伤检查点；1990 年：肿瘤易感性的遗传学基础，肿瘤遗传不稳定性的机制；1999 年：肿瘤单核苷酸多态性，肿瘤谱；2001 年：肿瘤靶向治疗。

近年来对肿瘤的研究发现，在发育生物学中起重要作用的信号通路，都在肿瘤中发生了突变，例如 Wnt, TGF- β 和 hedgehog 等^[1,2,3]。研究证实，肿瘤与正常干细胞的发育过程中，拥有共同的信号通路，信号通路的异常可以导致肿瘤的发生^[4]。基于对肿瘤的认识越来越深入，有关新的肿瘤治疗方法和模式也开始不断涌现，特别是肿瘤的靶向治疗得到前所未有的关注。所谓分子靶向治疗 (molecular targeted therapy) 是在分子水平上对肿瘤病因学、基因、受体等深入的认识基础上而发展起来的治疗方法^[5,6]。通常利用凋亡基因、自杀基因、细胞因子、溶瘤病毒、抑癌基因等进行肿瘤的基因治疗，以达到抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的坏死和凋亡。但是由于以上治疗特异性不强，故在治疗肿瘤的同时对全身其他的组织和脏器有损伤。

但本研究另辟蹊径，将移植过程当中最常发生的超急性排斥反应 (Hyperacute Rejection, HAR) 理论应用到肿瘤的治疗当中，使得肿瘤治疗更

具有靶向性。临床上主要多见于异种移植（如猪→人），基本理论如下：超急性排斥反应主要由受体（如人、猴）体内预存的天然抗体（Natural Antibody, NA）与异种供体（如猪）器官的血管内皮细胞上的 α -半乳糖苷酶抗原(Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R)即 α -Gal 抗原靶分子结合激活补体系统介导的溶解反应，导致移植物微血管系统内广泛的血栓形成，移植物迅速被破坏，从而使移植物丧失功能^[7-9]，而 α -Gal 抗原的表达依赖于编码 α -半乳糖基转移酶（ α -1,3Galactosyltransferase, α 1,3GT）基因功能正常，该酶存在于非灵长类哺乳动物而不存在于人类、大猩猩和旧世界猴等高级灵长目细胞内。这是由于在人类等高级灵长目进化过程中编码 α 1,3GT 的基因是一个假基因或可能是经历了读码框架移动突变不再表达 α 1,3GT 的功能,故人类无 α -Gal 抗原表达^[10, 11]，但是由于胃肠道正常细菌的糖类与 α -Gal 的有交叉抗原，在交叉抗原的不断刺激下，人类、大猩猩和旧世界猴体内可以产生针对该表位的抗 α -Gal 抗体，也就是前述的体内预存的天然抗体。鉴于 α -Gal 抗原和抗 α -Gal 抗体在哺乳动物当中独特的进化现象，这使得我们可以将超急性排斥反应理论应用到抗肿瘤的治疗当中。更重要的是我们将导入异源基因 α 1,3GT 的重组质粒中插入hTERT 启动子，因为此启动子只有在肿瘤细胞及永生化的细胞系中具有很高的活性，在血管内皮细胞当中几乎无活性，故本研究的目的即让导入的异源基因 α 1,3GT 能特异的定位在肿瘤细胞当中表达 α -Gal 抗原，而在其他的组织（例如血管内皮细胞）中无表达，从而激活人体内的超急性排斥反应靶向杀伤肿瘤细胞。

1.1 肿瘤生长的最主要生物学特性

肿瘤是机体正常细胞在多种内、外因素，包括物理性、化学性和生物性因素长期作用下发生了质变，出现异常增生而形成的，可分为良性和恶性肿瘤两大类。前者生长缓慢，与周围组织分界清楚，不发生转移，对人体健康危害相对不大。后者多生长迅速，可转移至身体的任何部位，部分种类还会产生异常活跃性物质，破坏正常器官结构，影响其功能，晚期威胁患者生命。肿瘤组织在细胞形态、组织结构、代谢生长等诸多方面都与其起源的正常组织有不同程度的差异，在许多生物学特性上有别于正常细胞。

其生物学最主要的特性表现如下：

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库